

### **REMARKS**

Claims 1, 3-4 and 9-14 are pending in this application. By the Office Action, the specification is objected to because of various informalities, and claims 1-8 are rejected under 35 U.S.C. §103(a). By this Amendment, the specification is amended to comply with the formalities; claim 1 is amended to incorporate the limitations of claim 2, and then further amended to recite that substantially no sulfite is contained in the composition; claims 2 and 5-8 are cancelled; and new claims 9-14 are added. Support for the this amendment is found in the present specification at page 7, Table 1; support for new claim 9 is found at page 7, Table 1; support for new claim 10 is found at page 7, Example 1; support for new claims 11-14 is found at page 1, paragraph 2. No new matter is added.

#### **I. Objections to the Specification**

The Office Action first objects to the specification for failure to identify the BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION and the DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION. The specification is amended to identify these sections.

The Office Action also objects to the specification due to various spelling and grammatical errors. The specification is amended to correct these errors.

Reconsideration and withdrawal of the objections are respectfully requested.

#### **II. Rejection under 35 U.S.C. §103(a)**

Claims 1-8 are rejected under 35 U.S.C. §103(a) over Kumagai (U.S. Patent No. 6,872,709). By this amendment claim 1 is amended to incorporate the limitations of claim 2, and is further amended to recite that substantially no sulfite is contained in the composition. The claimed composition would not have been obvious based on the cited reference.

The cited reference discloses a pharmaceutical composition comprising 2 mg/mL glycyrrhizin ammonium salt, 1 mg/mL cysteine hydrochloride and 20 mg/mL aminoacetic acid. Such a composition would not have rendered obvious the claimed invention.

Specifically, the reference does not disclose a pharmaceutical composition wherein the concentration ranges are 8 to 16 mg/mL of glycyrrhizin, 3 to 6 mg/mL of cysteine and 80 to 160 mg/mL aminoacetic acid and the composition contains substantially no sulfite, as claimed in claim 1. Under MPEP 2144.05(I), where the claimed ranges and prior art ranges do not overlap, as is the case in the present applications, Applicants respectfully submit that the test is not whether the range is "critical" but whether the two non-overlapping ranges are "close enough that one skilled in the art would have expected them to have the same properties."

First, Applicants note that the two non-overlapping ranges are not "close" as that term has been interpreted by the case law. Specifically, in *Titanium Metals Corp. of America v. Banner*, 778 F.2d 775, 227 USPQ 773 (Fed. Cir. 1985) "close" is a difference of 0.05% in concentration. Here, the concentrations differ by at least 300%, and can differ by up to 800%. Clearly, in the field of pharmaceutical compositions as in the claimed invention and Kumagai, concentrations that differ by as much as 300-800% are not "close" such that one of ordinary skill in the art would have expected the respective compositions to have the same properties. Instead, the concentrations are vastly different, where Kumagai fails to teach or suggest the claimed invention.

Furthermore, these concentrations are so different that a person of ordinary skill in the art would not have expected them to have the same properties. In the formulation of pharmaceutical compositions, physical properties such as solubility and stability in solution are known to require fine precision. Specifically, in known compositions comprising low concentrations of glycyrrhizin, cysteine and aminoacetic acid, precipitation and degradation of the glycyrrhizin and cysteine respectively were a known problem (present specification page 2). In this way, the composition of the cited reference would also have inherently been subject to precipitation and degradation problems. Therefore, a person of ordinary skill in the

art would have expected a composition such as claimed, comprising at least 300% increased concentration, to have at least somewhat equally increased precipitation and degradation problems.

However, as Table 2 of the present application shows, increased concentrations of the present composition unexpectedly do not result in increased precipitation and degradation. Therefore, to the extent that the ranges are "close" at all, they are not close enough for a person of ordinary skill in the art to have "expected them to have the same properties" since the unexpected results shown in the present application demonstrate that they do not in fact have the same properties. Thus the reference does not teach or suggest the ranges of concentrations as claimed in claim 1.

Furthermore, to the extent that the Office Action rejected claim 2, which has been incorporated into amended claim 1, Applicants respectfully traverse the rejection of claim 2. The Office Action asserts that "omission of an element and its function is obvious if the function of the element is not desired." Applicants respectfully disagree with this assertion.

Applicants respectfully submit that the absence of sulfites in the presently claimed composition would not have been obvious over the cited reference, because the function of sulfites are as a stabilizer, when higher stability of the composition is the very property desired. Page 2 of the specification describes that sulfites are conventionally added to compositions comprising glycyrrhizin, cysteine and aminoacetic acid in order to increase stability, i.e. decrease precipitation and degradation. In this way, a person of ordinary skill in the art would not have expected to increase stability by lessening the amount of a stabilizer, much less by omitting it altogether. Therefore, the Applicants have demonstrated highly unexpected results by showing that stability can be increased by *not* including a compound that was known and conventionally used to increase stability.

Furthermore, Applicants respectfully believe that when the Office Action states "the element of the invention, sulfite, functions to cause the undesirable precipitation of glycyrrhizin and the reduction in the amount of cyteine. See table 1 on page 7 and table 2 on page 8 of specification in the instant application" that the Office Action is either misunderstanding the data or is improperly relying on Applicants' own invention to show the obviousness of Applicants' invention. The data shows the unexpected property that the conventional addition of sulfite to lower concentration compositions can be avoided in the claimed invention, despite the expectation that a higher concentration composition would have required the presence of the sulfite stabilizer.

In addition to the unexpected property, the claimed invention avoids the occurrence of adverse reactions, and it is advantageous to produce the presently claimed pharmaceutical composition, since a sulfite additive is not utilized.

Also, claim 1 is amended to recite that substantially no sulfite is contained in the composition. As seen in Table 1 on page 7 of the present specification, the amount of sulfite was calculated to only one decimal place. Therefore, for example, impurities or trace amounts of sulfites, such that sulfites are not present in any effective amount, could still be contained in the presently claimed composition.

Additionally, Applicants submit that the cited reference does not in fact disclose a composition containing substantially no sulfites. Specifically, Applicants submit that the cited reference was not properly translated from Japanese into English. The cited reference corresponds to and claims priority to Japanese patent application JP P2001-46565, which was published as Japanese Laid-Open Publication No. 2001-206849. Japanese Laid-Open Publication No. 2001-206849 is attached as Exhibit A. The noted portions of Kumagai relied upon in the Office Action are Column 5, line 46 to Column 6, line 6. These portions correspond to paragraphs 33-35 of Japanese Laid-Open Publication No. 2001-206849. An

accurate translation of these paragraphs is attached as Exhibit B. This accurate translation clearly shows that the formulation of the cited reference in fact includes sodium sulfite, not sodium bisulfate as indicated in the mis-translated U.S. Patent. Therefore, the cited reference merely discloses a conventional composition containing sulfites, and not the presently claimed composition containing substantially no sulfites.

Therefore, the reference does not teach or suggest the limitations of amended claim 1. Specifically, the reference at least fails to teach or suggest that increased stability of a composition of glycyrrhizin, cysteine and aminoacetic acid could be achieved at high concentrations without the use of sulfite as a stabilizer.

Therefore, amended claim 1 recites patentable subject matter and, as dependant claims dependant from claim 1, claims 3-4 and 8 also recite patentable subject matter.

Reconsideration and withdrawal of the rejection are respectfully requested.

### III. Conclusion

In view of the foregoing, it is respectfully submitted that this application is in condition for allowance. Favorable reconsideration and prompt allowance of the application is earnestly solicited.

Should the Examiner believe that anything further would be desirable in order to place this application in even better condition for allowance, the Examiner is invited to contact the undersigned at the telephone number set forth below.

Respectfully submitted,



James A. Oliff  
Registration No. 27,075

Samuel T. Dangremond  
Registration No. 60,466

JAO:STD/tjx

Attachments:

Petition for Extension of Time  
Amendment Transmittal  
JP A 2001-206849 and Partial English-language Translation

Date: December 3, 2007

**OLIFF & BERRIDGE, PLC**  
**P.O. Box 320850**  
**Alexandria, Virginia 22320-4850**  
**Telephone: (703) 836-6400**

DEPOSIT ACCOUNT USE AUTHORIZATION Please grant any extension necessary for entry; Charge any fee due to our Deposit Account No. 15-0461
--

Attachment A

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-206849

(P 2 0 0 1 - 2 0 6 8 4 9 A)

(43) 公開日 平成13年7月31日 (2001. 7. 31)

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A61K 31/7028		A61K 31/7028	
A61P 15/14	171	A61P 15/14	171

審査請求 有 請求項の数 7 O L 公開請求 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2001-46565 (P 2001-46565)	(71) 出願人	500541564 株式会社ティーセル研究所 宮城県仙台市青葉区南吉成 6-6-3
(22) 出願日	平成13年2月22日 (2001. 2. 22)	(72) 発明者	熊谷 勝男 宮城県仙台市青葉区桜ヶ丘 6-25-3
(31) 優先権主張番号	特願2000-358055 (P2000-358055)	(72) 発明者	貝 健三 宮城県仙台市青葉区西勝山 8-5-603
(32) 優先日	平成12年11月24日 (2000. 11. 24)	(72) 発明者	小岸 健一 宮城県仙台市青葉区小松島 2-28-18-50 2
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100083806 弁理士 三好 秀和 (外 8 名)

(54) 【発明の名称】 家畜の乳房炎治療剤及びこれを用いた乳房炎の治療方法

(57) 【要約】

【課題】 家畜の乳房炎を治療するための治療剤および治療方法を提供する。

【解決手段】 グリチルリチン又はその医薬上許容される塩を有効成分とする家畜の乳房炎治療剤とする。

(2)

特開2001-206849

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリチルリチン又はその医薬上許される塩を有効成分とする家畜の乳房炎治療剤。

【請求項2】 グリチルリチン又はその医薬上許される塩を有効成分とする泌乳期における家畜の乳房炎治療剤。

【請求項3】 グリチルリチン又はその医薬上許される塩を家畜の乳房に投与する家畜の乳房炎治療方法。

【請求項4】 グリチルリチン又はその医薬上許される塩を家畜の乳房に直接注入する家畜の乳房炎治療方法。

【請求項5】 グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期における家畜の乳房に直接投与する家畜の乳房炎治療方法。

【請求項6】 前記家畜は、ウシである請求項1又は2に記載の家畜の乳房炎治療剤。

【請求項7】 前記家畜は、ウシである請求項3、4又は5に記載の家畜の乳房炎治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、家畜の乳房炎治療剤およびこの治療剤を用いた乳房炎の治療方法に関する。より詳しくは、家畜の泌乳期における乳房炎の治療剤および治療方法に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に家畜といわれる哺乳動物、例えば、ウシ、馬、山羊、羊、豚及びウサギは、乳腺を有するため乳房炎に罹り得る。これらの家畜の中でも、頻繁に搾乳が行われる家畜、例えばウシ、特に、乳牛は最も乳房炎に罹りやすい。乳牛にとって、乳房炎は最も治りにくい疾病の1つとさえ云われている。特に、近年は、多数飼育と搾乳機の普及による搾乳ストレスの増加とによって、乳房炎が多発する傾向にある。そのため、潜在的な罹病牛も含めれば、全泌乳牛の1/4もの高率の乳房炎が、絶えず乳房炎に罹病している。

【0003】乳房炎に罹病すると体細胞数が増加し、製品の品質や風味に悪影響を及ぼすことが報告されている。健康乳牛の原乳中体細胞数（以下、「SCC」という。）は、 $\leq 50$ 万個/mLである。これに対して、乳房炎に罹患した乳牛の原乳中のSCCは、 $\geq 160$ 万個/mLにまで増加すると報告されている。また、統計学的調査によれば、SCCが5万個/mL以下の領域においてSCCが2倍に増加するごとに、1日当たりの原乳の生産量は初産牛で0.4kg、経産牛で0.6kg減少すると報告されている。さらに、SCCが2倍に増加するごとに、原乳中の脂肪が0.2g/kg減少することが報告されている（Am. J. Vet. Res., 29巻, 497, 1968年）。

【0004】当然のことながら、乳房炎に罹患した乳房から採取された乳汁は、出荷停止されることになる。そのため、本疾病によって生ずる経済的損失は極めて大

い。

【0005】乳房炎は難治性であるが、その第1の理由として、乳房炎が極めて多様な細菌の感染によって惹起されていることが考えられる。例えば、スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、ストレプトコッカス・アガラクチエ（*Streptococcus agalactiae*）、ストレプトコッカス・ジスアガラクチエ（*Streptococcus diagalactiae*）、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）、コリネバクテリウム・ピオゲネス（*Corynebacterium pyogenes*）などが代表的な起因菌として挙げられる。これらの菌による感染は、多頭飼育やミルク搾乳頻度の増加などのストレスが、乳牛に加えられることによって起こり、感染数は、近年、益々増加している。

【0006】難治性である第2の理由は、乳房炎が一般的な概念で通常細菌疾患と同列に考えて、乳房炎の防御を感受性の強い抗菌剤の使用のみに頼りすぎることにあると考えられる。また、感受性の強い抗菌剤のみに頼るあまり、乳房炎の発症病理機構や感染の慢性化機構の研究を軽視しがちになっている。乳房炎の感染が認めらるると、フラン剤、サルファ剤等の抗菌薬剤や、ペニシリン系、セフェム系、ストレプトマイシン系、テトラサイクリン系、マクロライド系などの抗生物質を選択し乳房内へ注入することが、一般的な防御手段とされる。

【0007】しかし、これらの抗菌性物質は原乳中に残留すると耐性菌の発生などにより、ヒトの健康を阻害するおそれがある。そのため、抗菌性物質を使用する期間は厳しく制限されている。また、世界的に、これらの抗菌剤の使用には種々の制約が加えられている。その結果として、不十分な防除効果しか得られていなくても、やむを得ず投薬を中止しなければならない場合も少なくない。それゆえ、休薬後間もなく感染症の再発を来すことに悩まされることもしばしばある。

【0008】さらに、乳房炎が難治性である第3の理由は、泌乳牛の乳腺は、その泌乳サイクルである泌乳期と乾乳期とにおいて、異なった免疫組織から成るからである（Vet. Immunol. & Immunopathol., 65巻, 51-61, 1998年, J. Dairy Sci., 82巻, 1459-1464, 1999年）。実際のところ、このことが乳房炎を難治性にしている最大の理由であるかもしれない。つまり、この両期において、乳腺組織内での細菌の感染様式は異なり、また、乳腺自体の感染防御機構も大きく異なるからである。

【0009】分泌活動が行われる10ヶ月もの長い泌乳期間における乳腺と、分泌乳汁中の免疫組織とは、乳汁分布を営む上皮細胞の調節を自ら行うCD8<sup>+</sup>T細胞と $\gamma\delta$ <sup>+</sup>T細胞とから主体に構成されている。したがって、この泌乳期間中の乳腺の免疫機能は、Th1（ヘルパーT細胞の一群）による細胞性免疫機構を中心に営まれている。

【0010】一方、乾乳期に入った乳腺と乳汁の細胞と

10

30

40

50



(3)

特開2001-206849

3

は、血液や脊髄に由来する白血球系の細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞とB細胞とから主体に構成されている。したがって、免疫機能は、食菌反応と、抗体及び補体を中心とした液性免疫とを中心に営まれている。

【0011】つまり、両者は、相互に極めて対比的な免疫機能を有しており、また、対比的な感染防御を行うのである。したがって、その感染防御対策も、自ら、異なっているべきである。しかしながら、従来における乳房炎の防除対策において、このような面があまり考慮されていなかった。

【0012】一方、グリチルリチンについては、マウス等の実験動物における多彩な免疫学的作用が報告されている。例えば、グリチルリチンはリンパ球を刺激して、IFN(インターフェロン)の産生を誘導し(Microbiol. Immunol., 26巻, 535-539, 1982年)、NK(ナチュラルキラー)細胞のキラー活性を増強する(Excerpta Medica(国際会議シリーズ), 641巻, 460-464, 1983年)。さらに、グリチルリチンは、マウスにおいて胸腺の関与無しに、腸管や肝臓等の粘膜臓器に選択的に分布している $\gamma\delta$ <sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞とを含む胸腺外分化T細胞の活性化を、促すことが知られている(Biotherapy, 5巻, 167-176, 1992年)。そのほか、グリチルリチンは、ヘルパーT細胞(特にTh1ヘルパー細胞)の活性化に基づいて、細胞性免疫の増強などを促し、レトロウイルスを含む種々のウイルス感染症の防御(Biotherapy, 9巻, 209-220, 1996年)や、皮膚でのアレルギー反応の抑制などにも関与することが知られている。そして、火傷などに基づく免疫不全マウスにおいて、グリチルリチンによる免疫活性の増強によって、ヘルペスウイルス(Immunol. Lett., 44巻, 59-66, 1995年)や各種細菌(Antimicrob. Agent Chemother., 22巻, 612-617, 1996年)による粘膜感染死を防御する効果なども証明されている。

【0013】また、微生物感染への作用は、ヒトのウイルス疾患でも試験済みであり、内服並びに静脈内投与によってウイルス性肝炎の抑制作用なども報告されている(Asian Med. J., 26巻, 423-438, 1983年、Microb. Immunol., 44巻, 799-804, 2000年)。さらに、グリチルリチンを抗炎症剤としてヒトの皮膚外用薬として用いられた例も知られている(特開平6-305932)。さらに、グリチルリチンを吸収促進剤とするヒトの経鼻吸収薬が用いられた例も知られている(Drug Delivery System, 4巻, 88-93, 1989年)。

【0014】しかし、マウス等の実験動物での免疫学的作用やヒトでの抗炎症作用等を有するグリチルリチンを、家畜の乳房炎に適用するという概念は知られていなかった。ましてや、上述した複雑な免疫機能を有し、各種細菌感染に基づくウシの乳房炎にも適用するという概念は全く知られていなかった。

【0015】

4

【発明が解決しようとする課題】本発明は、家畜の乳房炎を治療するための治療剤および治療方法を提供することを課題とする。

【0016】より詳しくは、家畜の泌乳期における乳房炎の治療剤を提供することを課題とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、グリチルリチンが泌乳期の家畜の乳房における免疫機能を高めることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0018】即ち、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許容される塩を有効成分とする家畜の乳房炎治療剤を提供する。

【0019】更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を有効成分とする泌乳期における家畜の乳房炎治療剤を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を家畜の乳房に投与する家畜の乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を家畜の乳房に直接注入する家畜の乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期における家畜の乳房に投与する家畜の乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期における家畜の乳房に直接投与する家畜の乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期におけるウシの乳房に投与する乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩をウシの乳房に直接注入する乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期におけるウシの乳房に投与する乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期におけるウシの乳房に直接投与する乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、グリチルリチン又はその医薬上許される塩を泌乳期におけるウシの乳房に直接注入する乳房炎治療方法を提供する。更に、本発明は、カニユーレによりウシの乳房に直接注入する乳房炎治療方法を提供する。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明における乳房炎の治療剤の有効成分は、次式で表されるグリチルリチン又はその医薬上許容される塩からなる。

50 【0021】

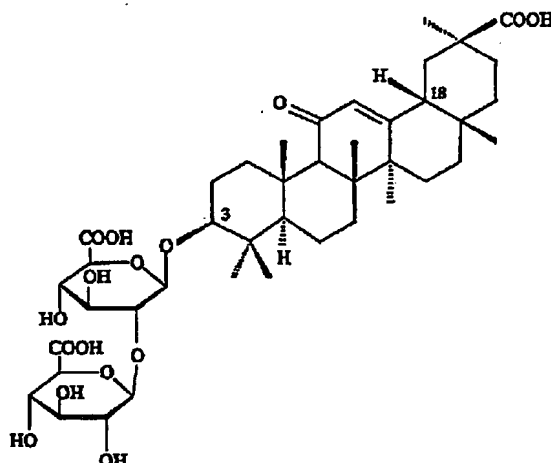
(4)

特開2001-206849

5

6

【化1】



本発明に用いられるグリチルリチン（グリチルリチン酸）は、甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisher, *Glycyrrhiza Glabra* Linne）又はその他の同属植物（*Glycyrrhiza inflata* Batalin, *Glycyrrhiza korshinskyi* G. Grig., et al.）等の根およびストロンを、水、メタノール、エタノール、*n*-ブタノール等のグリチルリチン可溶の溶媒で抽出することにより得られる。また、市販されているグリチルリチンを使用しても良い。

【0022】また、その薬理学的許容される塩としては、グリチルリチンと無機又は有機の塩基とを、（1：1）、（1：2）又は（1：3）のモル比で作用させて得られるグリチルリチンアンモニウム塩、グリチルリチンアルカリ金属塩又はグリチルリチンコリン塩等が挙げられるが、ウシおよび乳汁を摂取するヒトに対する安全性が保証されれば、必ずしもこれらに限定されるものではない。本発明においては、単独のグリチルリチンを、その塩の1種を又は任意の2種以上の混合物を有効成分としても治療剤を形成してもよい。

【0023】また、グリチルリチンを出発物質として用いられる通常の化学合成により得られるグリチルリチンの誘導体も、乳房炎の治療に有効である限り、有効成分として治療剤を形成することができる。

【0024】これらの有効成分を含有する治療剤の剤型としては、グリチルリチン又はその塩を軟膏基剤に均一に分散して軟膏とするか、あるいは、水又はエタノールなどの適当な溶媒に溶かして液剤とする等がある。これらは従来公知の技術を用いて製造することができる。また、市販のグリチルリチンを含む治療剤を利用することもできる。

【0025】軟膏とするために用いられる軟膏基剤として、次に挙げる例に限定はされないが、例えば、白色ワセリン、黄色ワセリン、流動パラフィン、オリーブ油、ラッカセイ油、ダイズ油、ラノリン等の親油性軟膏基剤、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸ナトリウム、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ステアリン

酸アルミニウム、グリセリン、アルギン酸ソーダ、カルボキシメチルセルロース等の親水性軟膏基剤が挙げられる。

【0026】液剤に用いる溶媒として、次に挙げる例には限定はされないが、上述の他に、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリン等が挙げられる。

【0027】上記薬剤には、さらに、緩衝剤、等張化剤、安定化剤、防腐剤などを任意に加えてもよい。

【0028】本発明の薬剤は、食品添加物として用いられるグリチルリチンを有効成分とするため、グリチルリチンが原乳中に残留しても、ヒトの安全性に関して問題がない。したがって、とりわけ泌乳期のウシの乳房炎に対して有効である。

【0029】グリチルリチン又はその塩の投与量は、例えば、1分房当たり400～800mgが好ましく、症状により適宜変更可能である。また、乳汁中におけるグリチルリチンの濃度は、0.08～0.4mg/mLとなる様に投与するのが好ましい。これらの値は、人体において用いられる投与量を、乳房内の乳汁量に換算して決定されたものである。

【0030】投与サイクルとしては、上記量の薬剤を1日1回で投与することも可能であるが、1日2回またはそれ以上の回数に分けて投与しても良く、また、数日に分けて投与しても良い。

【0031】投与方法としては、軟膏および液剤の場合、乳房に直接注入する。直接注入する方法としては、例えば、カニューレ、注射器による方法が挙げられるが、投与量を考慮するとカニューレによる方法が好ましい。

【0032】

【実施例】以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0033】臨床型乳房炎を発症したホルスタイン泌乳牛7例において、下記の処方のグリチルリチン治療剤

20

30

40

50

(5)

特開2001-206849

7

8

(株)ミノファージェン製薬;強力カネオミノファージェンシー)を用いて、実施例1~5および実施例6, 7に記載の要領でそれぞれ治療試験を実施した。

【0034】(実施例1~5)投与量および投与方法は、グリチルリチン(GL)として400mg相当の治療剤を、発病を認知した0日目に、カニューレを用いて乳房炎発症分房の乳房内に投与した。治療試験についての評価を、0, 1, 2もしくは3, 7, 14および21日目に実施した。治療試験の評価については後述する。これらの結果を表1~5に各々示す。

【0035】グリチルリチン治療剤の処方(強力カネオミノファージェンシー)

・グリチルリチンモノアンモニウム塩(グリチルリチンとして2.0g)

・アミノ酢酸	20.0g
・L-システイン塩酸塩	1.0g
・塩化ナトリウム	5.0g
・乾燥亜硫酸ナトリウム	0.8g

上記処方に水を加え、1000mLとし、pH6.7および浸透圧比約2の透明な溶液の治療剤を調製した。

【0036】(実施例6, 7)実施例6においては乳房炎発症分房の乳房内にグリチルリチンとして400mg相当の上記治療剤を、実施例7においては800mg相当の上記治療剤を、試験開始0日目及び3日目に投与した。実施例1~5と同様に、投与方法および治療の評価は、実施例1~5と同様に行った。これら結果を表6および7に示す。

【0037】(治療試験の評価)治療試験を、臨床所見および乳汁検査を行うことにより評価した。

【0038】臨床所見の測定は、「乳房の膨張と硬直」および「乳汁中の凝固物(ブツ)」について行った。また、乳汁検査の測定は、「乳汁の凝集度」、「乳汁のpHによる判定」、「乳汁の体細胞数」および「乳汁顆粒球数」について行った。各項目の欄に判定方法を記す。

【0039】なお、測定項目のうち「乳汁中凝固物(ブツ)」並びにカリフォルニア・マスティティス・テスト(California Mastitis Test: 以下、CMTとする。)変法による「乳汁の凝集度」および「乳汁中のpHによる判定」の評価基準は、「家畜共済における臨床病理検査要項(農林水産省経済局編)平成9年改定版」に基づいて評価した。

【0040】(乳房の膨張と硬結)触診により、乳房の膨張および硬結を評価した。評価基準は以下の通りである。

++ : 乳房全体に膨張があり、硬結の程度が著しいもの。  
+ : 乳房が局所的に膨張しており、硬結のあるもの。  
± : 乳房がやや硬いもの。  
- : 乳房の膨張・硬結が認められないもの

【0041】(乳汁中の凝固物(ブツ))黒い網又は布を付けたストリップカップに乳汁を前搾りし、ブツに関する評価を目視により行った。評価基準は以下の通りである。

++ : ブツが大きく、数の多いもの。凝固物の数(≥3個/mL)  
+ : ブツは大きい、数が少ないもの。凝固物の数(0.5~3個/mL)  
± : ブツが小さく、数の少ない物。凝固物の数(≤0.5個/mL)  
- : ブツが全く確認されないもの。

【0042】(乳汁の凝集度)市販のキット(日本全薬(株);PLテスター)を用いて、CMT変法の評価基準に基づいて、凝集度を判定した。具体的には、市販のCMT変法のパドルに生乳を分房別に約2mlずつ採取し、CMT変法の試薬を等量加える。パドルを静かに1分間回した。その後、凝集度を判定した。評価基準は以下の通りである。

+++ : 直ちにゲル化し、パドルの回転を止めても底中央に山を生じる。  
++ : 直ちにゲル化するが、パドルの回転を止めると底一面に広がる。  
+ : はっきり凝集するが、ゲル化の傾向は認められない。  
± : わずかに凝集が認められるが、生乳は滑らかに流れる。  
- : 凝集が認められず、パドルを傾けると生乳は滑らかに流れる。

【0043】(乳汁中のpHによる判定)上記凝集と同様に市販のキットを用いて、CMT変法の評価基準に基づきpH評価を行った。評価基準は以下の通りである。  
+++ : 暗緑色。  
++ : 緑色を帯びたもの。  
+ : わずかに緑色を帯びたもの。  
- : 黄金色または黄色。

【0044】(乳汁中の体細胞数(SCC))SCCは、乳汁をエタノールと混和後、細胞を4℃で静置し、プロピジウムイオダイド(Propidium Iodide (PI))で核を染色した。陽性細胞数のカウントは、FACS Calibur (Becton-Dickinson)を用いて解析することにより測定した(日畜会報, 70巻, J169-176, 1999年)。

【0045】(乳汁中顆粒球(PMN)数)乳汁中PMN数は、乳汁をリン酸生理緩衝液(PBS)で洗浄後、細胞をCytospin (Shandon Scientific Ltd.)を用い、スライドガラス上に付着させた後、ギムザ染色を行い顕微鏡下でPMN数を測定した(日畜会報, 70巻, J169-176, 1999年)。

【表1】

(6)

特開2001-206849

9

10

## 実施例1

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の腫脹と硬結	+	+	±	-	-	-
	乳汁中の凝固物	+	+	-	-	-	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	++	±	±	-	-	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	±	-	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	416	215	88	7	2	0.3
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	359	173	58	3	0.6	Nt
	起炎菌	グラム陽性桿菌					

本例においては、グリチルリチン投与後、乳房炎診断マーカーであるCMT測定値ならびに体細胞数が急速に改善した。さらに、臨床症状も投与2日後には殆ど消失し、投与4日後には市場に出荷できる程度まで回復し

た。

【0046】

【表2】

## 実施例2

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の腫脹と硬結	-	-	-	-	-	-
	乳汁中の凝固物	±	-	-	-	-	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	++	+	-	-	-	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	-	-	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	202	7	5	9	42	40
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	96	2	0.6	Nt	24	Nt
	起炎菌	グラム陽性桿菌、コアグラール陰性白色ブドウ球菌(溶血性)					

本例において、臨床症状は実施例1ほど顕著ではないが、実施例1と同様に乳房炎診断マーカーのCMT測定値ならびに体細胞数の上昇が顕著であったが、グリチルリチンの投与によりその値の減少が早期に確認された。 30

投与3日後には出荷が可能となる程度まで回復した。

【0047】

【表3】

## 実施例3

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の腫脹と硬結	++	-	-	-	-	-
	乳汁中の凝固物	+	+	-	-	-	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	+++	-	±	-	-	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	+	-	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	518	1061	143	75	68	8
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	346	359	66	39	38	5
	起炎菌	グラム陽性桿菌、コアグラール陰性白色ブドウ球菌					

本例においては、CMT測定値ならびに臨床症状の改善が早期に認められた。すなわち、体細胞数は実施例1および2に比べて高い値を示していたが、投与5日後には

出荷が可能となる程度まで回復した。

【0048】

【表4】

(7)

特開2001-206849

11

12

## 実施例4

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の膨脹と硬結	+	+	-	-	-	-
	乳汁中の凝固物	++	+	-	-	-	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	+	+	±	-	-	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	±	±	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	328	60	40	15	14	55
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	314	27	4	9	ND	Nt
	起炎菌	グラム陽性桿菌					

本例においては、体細胞数の改善が顕著であった。また、臨床症状、CMT測定値も早期に改善され、投与2日後には出荷が可能となる程度まで回復した。

【0049】

【表5】

## 実施例5

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の膨脹と硬結	+	-	-	-	-	-
	乳汁中の凝固物	++	++	±	-	-	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	±	±	-	-	-	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	-	-	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	1298	376	251	74	36	Nt
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	1060	121	17	6	29	Nt
	起炎菌	コアグラール陽性黄色ブドウ球菌、溶血性グラム陽性桿菌					

本例においては、他の例と比較して投与日における体細胞数が最も高かった。しかしながら、グリチルリチン投与7日後には体細胞数が低下し、出荷できる程度まで回復した。

【0050】

【表6】

## 実施例6

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の膨脹と硬結	++	±	-	-	-	-
	乳汁中の凝固物	+	-	-	-	-	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	±	-	-	-	-	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	-	-	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	197	171	85	129	10	5
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	189	89	2	6	0.1	0.05
	起炎菌	コアグラール陰性白色ブドウ球菌、グラム陽性桿菌					

本例においては、乳房炎の臨床症状の改善が顕著であった。乳汁体細胞は初回投与後低下傾向を示したが、2回目投与後（試験開始7日目）に若干増加した。さらに、14日目には出荷できる程度まで回復した。

【0051】

【表7】

(8)

特開2001-206849

13

14

実施例7

		治療開始後の日数					
		0日目	1日目	2日目	7日目	14日目	21日目
臨床所見	乳房の膨脹と硬結	++	+	±	-	-	-
	乳汁中の凝集物	++	-	-	-	+	-
乳汁検査	乳汁の凝集度 (CMT変法)	++	±	±	-	++	-
	乳汁のpHによる判定 (CMT変法)	±	-	-	-	-	-
	乳汁中の体細胞数 (SCC×10 <sup>4</sup> 個/mL)	499	1080	673	469	700	45
	乳汁中の顆粒球数 (PMN×10 <sup>4</sup> 個/mL)	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
起炎菌		グラム陽性桿菌					

全例ともグリチルリチンの投与後2～3日の間で、臨床症状、乳汁検査等のいずれの所見にも顕著な改善が認められ、1回の投与の実施例(1～5)では投与後2～5日、遅くとも7日後に出荷が可能となった。また、2回投与を行った実施例では、14日もしくは22日後に出

荷ができる程度まで回復した。表8に、上記の乳房炎発症乳房にGLを投与した7例、すなわち、実施例1～7についての、乳汁の凝集度の判定結果のみをまとめた。

【表8】

GL投与例

		治療開始後の日数		
		0日目	2又は3日目	21日目
乳汁検査 I 乳汁の凝集度 (CMT変法)	実施例			
	1	++	±	-
	2	++	-	-
	3	+++	±	-
	4	+	±	-
	5	±	-	-
	6	±	-	-
	7	++	±	-

これに対して、対照薬剤としてセファゾン製剤を主体とする抗生物質による治療を、臨床型乳房炎を発病したホルスタイン泌乳牛の乳房6例において、以下の比較例1～6に従っておこなった。比較例1～6について、乳汁の凝集度の判定を行った結果を表9示す。

(比較例1～6) セファゾン製剤を主体とする抗生物質

抗生物質投与例

		治療開始後の日数		
		0日目	2又は3日目	21日目
乳汁検査 I 乳汁の凝集度 (CMT変法)	比較例			
	1	++	++	++
	2	+++	+++	+++
	3	+++	++	++
	4	++	++	+++*
	5	++	++	-
	6	+++	+++	-

\* ) 乳房炎悪化のため、搾乳が停止され廃用処分を受けた。

GL投与群7例では、投与早期(2又は3日目)には、CMTの低下が起こり、21日目では全例で陰性となっていた。これに対して、対照の抗生物質療法群6例では、療法後21日目で、4例中2例にCMT陰性化が認められたが、他の4例には全く改善は認められなかった。

【0052】

(商品名:セファメジンS、販売元:藤沢薬品工業(株)、セファメジン9g中にセファゾリン450mg(力価)を含有)9gを、実施例1～5と同様の方法で、乳房6例に投与した。実施例1～5と同様に、乳汁の凝集度についてCMT変法による検査を行った。

【表9】

【発明の効果】本発明により、家畜の乳房炎を治療するための治療剤及び治療方法を提供することができる。また、特に家畜の泌乳期乳房炎の治療剤を提供することが出来る。さらに、食品添加剤としても用いられるグリチルリチン又はその塩を、ウシの乳房炎治療に用いることにより、ヒトの安全性に関わる問題を緩和することが可能となる。

Attachment B

Partial English Translation ( [0033] to [0035] ) of Japanese Laid-Open Publication No.2001-206849 corresponding to Kumagai et al. (US 6,872,709, from line 46 of column 5 to line 10 of column 6).

**[0033]**

Therapeutic tests were performed in seven cases of clinical type mastitis of Holstein cow using a glycyrrhizin therapeutic agent (Stronger Neo-Minophagen C made by Minophagen Pharmaceutical Co.) using the method described in the following Examples 1 to 5, 6 and 7.

**[0034] Examples 1 to 5**

The therapeutic agent containing 400 mg equivalence glycyrrhizin (GL) was administered into the mamma manifesting mastitis using a cannula on day zero of recognition of the disease. The results of treatment were evaluated on day 0, 1, 2, or 3, 7, 14, and 21, which will be described hereinafter. These results are shown in Tables 1 to 5.

**[ 0035 ] Formulation of the glycyrrhizin therapeutic agent (Stronger Neo-Minophagen C)**

- Glycyrrhizin Ammonium Salt (2.0 g as glycyrrhizin)
- Aminoacetic Acid 20.0 g
- L-Cysteine Hydrochloride 1.0 g
- Sodium Chloride 5.0 g
- Anhydrous Sodium Sulfite 0.8 g

The above formulation was dissolved into water to a final volume of 1000 mL, and its pH and osmotic pressure were adjusted to 6.7 and about 2, respectively, to prepare a therapeutic agent of the invention as a clear solution.